用尖吻蝮蛇毒、蝮蛇毒及抗蛇毒血清处理小鼠S_{180}、EAC腹水癌的初步观察

熊郁良 王婉瑜 刘念昆 杨长久 攸福生
(中国科学院昆明动物研究所)

摘 要

本文报道了尖吻蝮蛇毒、蝮蛇毒及抗蛇毒血清能使接种S_{180}、EAC腹水癌的小鼠明显延长存活时间、降低接种率，但不能完全阻止癌细胞生长。体外具有较明显的导致癌细胞肿胀、膜破裂、核纤维化、坏死等。从腹水酶活力测定及抗血清初步研究结果表明，癌细胞病变中产生的某些抗原物质可能与蛇毒中的酶和毒蛋白相近。因此注射蛇毒后可在体内产生相关抗体，中和癌细胞产生的毒素以达到治疗目的。

关键词：S_{180}，EAC，蝮蛇毒，尖吻蝮蛇毒，抗蛇毒血清

蛇毒对肿瘤细胞的作用国内外报道较多（Braganca, 1974），但多着重在体外对癌细胞的杀死作用和体内抑制作用。近年来上海徐汇区医院等采用口服眼镜蛇毒和蝮蛇毒等治疗各种癌症患者取得较好疗效。为增进有关蛇毒治疗肿瘤的认识，本文以抗蛇毒血清和蛇毒纯组分进行了初步对比观察。

材 料 和 方 法

材料：

蝮蛇（*Agkistrodon halys*）毒：浙江产；尖吻蝮蛇（*Agkistrodon acutus*）毒：湖南产；尖吻蝮、蝮蛇毒精制抗蛇毒血清：上海生物制品研究所生产；尖吻蝮去纤酶、蝮蛇毒纤溶组分：本实验室分离、制备；小白鼠：昆明种，本所饲养场提供，体重20±2克；瘤种：昆明医学院药理教研室提供。

方法：

1.接种：按常规接种后7天抽取腹水，以生理盐水稀释至8×10^{-6}，每只鼠注射0.2ml。

2.给药：各组小鼠接种后立即在皮下或腹腔按组分别注射以上纤溶组分，去纤酶0.2ml（含量见表2）或抗蛇毒血清0.2ml。接种后第2、4、7天再按上述方法进行

本文1988年8月15日收到，1990年1月9日修回。

注射，每次注射量同上。对照组接种后不给药。

3.酶活力测定：取腹水 0.2ml 按王婉瑜等方法（1983）测定精氨酸酯酶、蛋白水解酶，用纤维蛋白平板测定纤溶酶活性。

4.体外试验：用生理盐水稀释蝮蛇毒、尖吻蝮蛇毒至1mg/ml，取0.2ml加接种 7 天的腹水抽出液 0.2ml，37℃保温10分，台酚兰染色（1%），相差显微镜计数各种死细胞的百分率。

5.体内效应：分别抽取体内接种后 7 天的给药组和对照组的腹水，用生理盐水稀释至10^7～10^8个癌细胞，统计各组结果。

实 验 结 果

1.体外实验 用台酚兰染色后，在相差显微镜下按组统计300个细胞，计算癌细胞数的平均死亡率。结果见表 1。

表1 各组死细胞数百分率

组别 / 项目	对照组		蝮蛇毒组 (1mg/ml)		尖吻蝮蛇毒组 (1mg/ml)		去纤酶组 (100μg/ml)		纤溶酶组 (100μg/ml)	
	S_{180}	EAC	S_{180}	EAC	S_{180}	EAC	S_{180}	EAC	S_{180}	EAC
死细胞(%)	21.8	25.5	81.3	80.5	87	91.3	43.1	37.5	40.3	48.0

2.体内试验：

（1）腹腔注射：结果表明尖吻蝮蛇毒、蝮蛇毒和尖吻蝮蛇毒去纤酶，蝮蛇毒纤溶酶对小鼠 S_{180}、EAC 腹水癌均有一定抑制作用（$P<0.01—0.05$）。见表 2。

表 2 尖吻蝮蛇毒、蝮蛇毒、去纤酶、纤溶酶对S_{180}、EAC腹水癌的抑制作用

组别	腹腔给药剂量			实验	实验	27天存活数(只)		存活率(%)		与对照比P值	
	1次	2次	3次	次数	动物数	S_{180}	EAC	S_{180}	EAC	S_{180}	EAC
对照组				3	30	2	1	0.7	0.3		
尖吻蝮蛇毒（μg/只）	10	10	10	3	30	16	14	53	49	<0.01	<0.01
去纤酶（μg/只）	25	25	25	3	30	6	4	20	13	>0.05	>0.5
蝮蛇毒（μg/只）	10	10	10	3	30	15	12	51	38	<0.01	<0.03
纤溶酶（μg/只）	50	50	50	3	30	4	5	13	15	>0.5	>0.5

（2）皮下注射：腹腔注射蛇毒可能会直接破坏肿瘤细胞，为了验证给药途径的效果，又进行了皮下给药试验。结果证明效果与腹腔注射相同或略有差异，这就表明蛇毒对肿瘤疗效除直接破坏肿瘤细胞外，尚可能与其它因素有关。结果见表 3。

（3）抗蛇毒血清实验：考虑到小剂量注射蛇毒给小鼠，能在动物体内产生对抗蛇毒的抗体，而肿瘤中分泌某些毒性物质是否与蛇毒蛋白有相关抗原，我们用腹腔、皮下注射抗尖吻蝮蛇毒和蝮蛇毒抗蛇毒血清进行对照，结果表明其抑瘤率与注射蛇毒相似，

同样具有明显保护率。结果见表4。

表3　尖吻蝮蛇毒、蝮蛇毒、去纤酶、纤溶酶对S_{180}、EAC腹水癌皮下注射的抑癌结果

组别	给药剂量 1次	2次	3次	4次	实验次数	实验动物数	27天存活数(只) S_{180}	EAC	存活率(%) S_{180}	EAC	与对照比P值 S_{180}	EAC
对照组						30	0	1	0	3.3		
尖吻蝮蛇毒（μg/只）	10	10	10	10	2	30	12	15	40	50	<0.01	<0.01
尖吻蝮蛇去纤酶(μg/只)	30	20	20	20	2	30	4	6	13	20	>0.5	<0.5
蝮蛇毒（μg/只）	10	5	5	10	2	30	12	11	40	37	<0.05	<0.05
蝮蛇毒纤溶酶（μg/只）	50	40	30	30	2	20	6	6	30	30	<0.01	<0.05

表4　尖吻蝮蛇毒、蝮蛇毒抗血清对S_{180}、EAC腹水癌的抑制作用结果

组别	给药剂量 1次	2次	3次	4次	实验次数	实验动物数	27天存活数(只) S_{180}	EAC	存活率(%) S_{180}	EAC	与对照比P值 S_{180}	EAC
腹腔注射尖吻蝮蛇毒抗血清（ml/只）	0.2	0.2	0.2	0.2	3	30	14	11	49	36.5	<0.01	<0.01
腹腔注射蝮蛇毒抗血清（ml/只）	0.2	0.2	0.2	0.2	3	30	19	14	63	47	<0.01	<0.01
皮下注射尖吻蝮蛇毒抗血清（ml/只）	0.2	0.2	0.2	0.2	3	30	13	16	44	53	<0.01	<0.01
皮下注射蝮蛇毒抗血清（ml/只）	0.2	0.2	0.2	0.2	3	30	10	12	33	40	<0.05	<0.05
对照组					3	30	1	0	0	3.3		

（4）接种率及存活时间：我们对皮下给药一组动物（每组10只）延长观察时间至56天，结果证明它们均能延长动物的存活时间。从接种率看血清组比粗毒差，而尖吻蝮蛇毒接种率最低，见表5。

表5　用尖吻蝮蛇毒、蝮蛇毒及抗蛇毒血清试治小鼠S_{180}、EAC腹水癌的初步观察

组别	动物数	S_{180}总存活天数	提高存活天数	EAC总存活天数	提高存活天数	56天存活只数 S_{180}	EAC	7天接种率(%)	与对照比P值
对照组	10	223		225		0	0	100	
尖吻蝮	10	366	143	319	94	3	2	0	<0.001
尖吻蝮蛇毒抗血清	10	353	130	255	130	2	2	40	<0.01
蝮蛇毒	10	371	148	385	158	3	3	30	<0.01
蝮蛇毒抗血清	10	372	149	370	145	2	1	50	<0.01

3.体内腹水渗出液及酶初步测定

取接种后14天的腹水经测定蛋白水解酶、精氨酸酯酶和纤维蛋白溶解活动都很强，

见表6。

表6　精氨酸酯酶、蛋白水解酶和纤维蛋白溶解平板测定结果

组别＼项目	蛋白水解酶	精氨酸酯酶	纤维蛋白溶解活性	
			标准平板（mm^2）	加热平板（mm^2）
S_{180}	＋＋－	＋＋＋	280	160
EAC	＋＋	＋	80	50
尖吻蝮蛇毒（mg/ml）	－＋	＋＋－	180	140
胰蛋白酶（1000U/ml）			210	241

4.腹水癌细胞的形态学变化

从体内腹水渗出情况看，实验组比对照组晚出现3—5天，其中注射尖吻蝮蛇毒抗蛇毒血清两组不仅腹水出现时间延迟，而且腹水渗出量和出血均明显减少，值得引起重视。细胞形态学变化比较明显，主要是细胞肿胀、膜破裂、核固缩、纤维化坏死等，在抗蛇毒血清实验组中观察到类似细胞免疫沉淀反应。见图1。

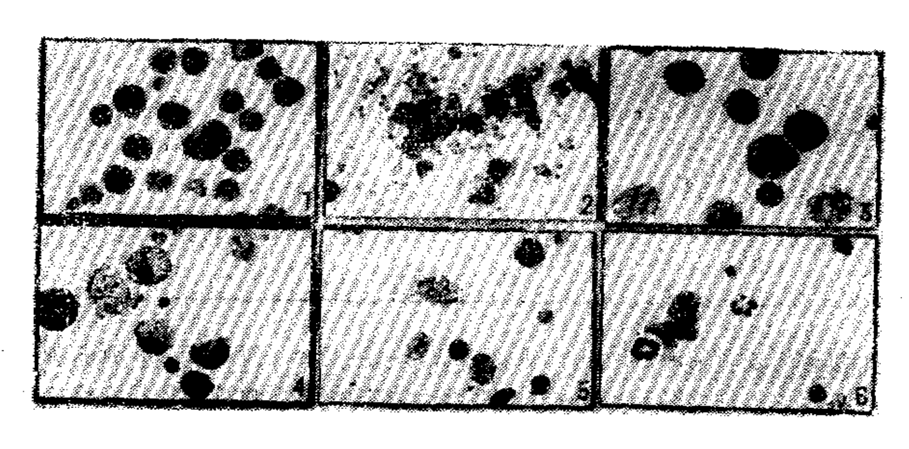


图1　腹水癌细胞的形态学变化

1　正常肿瘤细胞　2　肿瘤细胞聚集　3　肿瘤细胞膜出现孔洞、坏死
4　细胞膜破裂、坏死　5　细胞纤维化坏死　6　核固缩

讨　论

1.郝文学等（1978年）报道蛇岛蝮蛇毒对小鼠S—37、S_{180}体内具有抑制作用。临床观察20例胃癌患者治疗有效率75%，证明能改变病人临床症状，病理检查证明癌细胞变性、坏死和纤维化。Gaertner（1962年）用组织培养方法证明巴勒斯坦蝰蛇（*Vipera palestinae*）毒、彩锯鳞蝰蛇毒（*Echis colorate*）等对KB细胞株有致变和抑制作用，其中富含出血毒素的彩锯鳞蝰蛇毒抑制最强。我们的结果表明，尖吻蝮蛇毒和蝮蛇毒对肿瘤细胞有明显抑制作用，其中含较强出血毒的尖吻蝮蛇毒从抑瘤率及接种率降低方面

均明显高于其它蛇毒，结果与Gaertner 相似。

2.李栋梁等（1976）报道，利用组织培养方法筛选蛇毒对肿瘤细胞抑制和破坏作用，结果观察到肿瘤细胞肿胀、核固缩、溶解、纤维化等。我们采用腹腔和皮下注射方法在体内观察到细胞形态学变化与他们的结果相似。但我们还观察到肿瘤细胞在给抗蛇毒血清后粘附增加，肿胀和膜破裂等现象。

3.Georg Kelcti David. S 等曾报道布氏杆菌疫苗 BRV-PEL 对S_{180}腹水癌有效，卡介苗、狂犬病苗对实验小鼠 S_{180} 等也有一定疗效。本文报道尖吻蝮、蝮蛇毒抗蛇毒血清对 S_{180}、EAC腹水癌均有一定疗效，从肿瘤引起的病理变化出血、纤溶、纤维蛋白原降低等症状与蛇毒造成DIC 症状相似。其治疗机制有待进一步研究。

4.肿瘤腹水中具有明显的纤溶酶活性，但 S_{180}、EAC腹水中具有精氨酸酯酶活性尚未见报道，进而研究肿瘤患者血液和腹水中的酶，可能对肿瘤诊断、治疗提供新的依据。

5.我们的结果显示采用尖吻蝮蛇毒，蝮蛇毒抗血清治疗小鼠 S_{180}、EAC腹水癌可明显减少腹水量、延迟腹水出现和降低出血、延长存活时间，这可能与该两种抗血清中和肿瘤产生的出血毒、凝血酶样酶和纤溶有关。

6.蛇毒对肿瘤治疗作用国内外争议较大，从动物和临床方面均有不同意见。我们认为采用小剂量蛇毒可能导至机体产生抗毒血清，这点为抗血清治疗肿瘤有一定效果提供证据。其作用原理可能是肿瘤产生的某些出血，纤溶等病理变化产物被抗血清中和，故而延长存活时间。但需进行抗原抗体试验加以证明。

参 考 文 献

王婉瑜　1983　烙铁头（*Trimeresurus mucrosquamatus*）蛇毒的研究（Ⅰ）柱层析分离。　动物学研究　4（4）:329。

李栋梁等　1976　应用组织培养法筛选抗蛇毒中草药实验。　福建医大　（2）:6—11。

抗佰格等　1965　癌的病理生理学。人民出版社。

柯尔德等　1963　癌的扩散。　上海科学技术出版社。

郝文学　1978　蝮蛇毒抗肿瘤试验及治疗胃癌的初步总结报告。蛇岛　辽宁省卫生局。

Bragenca. B.M.　1974　Cytotoxic proleins cobra venom as probes for membrane structure. Biomembranes: Archit. Biog. Bivenerg. Differ. Rzoc. Int. Symp. P 201.

Chen Li zhu　1989　The clinical efficacy of snake venom capsule "787" is advanced stage malignant tumors. International Symposium of Natural Toxins May　22—25, P 194.

Gaertner　1962　Pathological changes on CEC by vipera palestinae and Echio colorata. *J.Immunology* **88**, 526.

Ichjei SATO, *et al.*　1964　Studies on habu snake venom VI: Cytotoxic effect of habu (*T. fluvoviridis hallawell*) and cobra (*Naja naja*) venom on the cells in vitro. *Japan. J. EXP.*　34(3):119—124.

Liang quangyu　1989　Snake venoms capsule cures cancers. *International Symposium of Natural Toxins.* May　22—25, P 193.

TREATMENT OF S_{180}, EAC ASCITES OF MICE WITH CROTALINE SNAKE VENOMS AND ANTIVENIN

Xiong Yuliang Wang Wanyu Liu Niankun
Yang Changjiu You Fusen

(Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica)

This paper reported the treatment of S_{180}, EAC ascites of mice with crotaline snake venoms and antivenin. After inoculating S_{180}, EAC ascites to mice, then injected *Agkistrodon acutus* and *A. halys* venoms and *Agkistrodon acutus*, *A. halys* antivenin, the injected mice survived longer than control group and their inoculation rates decreased, but they cannot completely prohibit the growth of S_{180} and EAC ascites. The cancer cells showed the changes of necrosis, fibrosis etc. The analysis of S_{180} ascites showed the activities of arginine esterase and fibrinolysis. The activities of arginine esterase and fibrinolysis are the same as that of snake crude venoms. The treatment effect of injecting antivenin is the same as that of injecting crude venom, therefore we consider that the crude venoms can treat S_{180} and EAC ascites may be relative to the antibodies produced by mice.

Key words: S_{180}, EAC, *Agkistrodon halys* venom, *A. acutus* venom, Antivenin